

201123016A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の
解析に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 信澤枝里

平成 24(2012)年 3 月

目 次

平成 23 年度

I 総括研究報告書

- 新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の解析に関する研究 P. 1
研究代表者：信澤枝里

II 分担研究報告書

1. 病原性及び重症化要因の解析-気管支喘息モデル動物における新型インフルエンザウイルス感染の病態解析 P. 14
研究分担者：長谷川秀樹
研究協力者：川口 晶 鈴木忠樹 佐藤由子
 2. 新型インフルエンザ H1N1 の HA 分子の抗原構造の解析 P. 22
研究分担者：松寄葉子
研究協力者：菅原勘悦
 3. ヒト抗体による新型ウイルスHA上の抗原領域の認識機構の解析 P. 27
分担研究者：信澤枝里
協力研究者：中内美名 廣津伸夫 萩原温久
 4. 新型インフルエンザウイルスを認識するモノクローナル抗体の作製 P. 31
研究分担者：高橋宜聖
研究協力者：阿戸 学 小林和夫 萩原温久 築地 信
 5. 新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の解析 P. 35
研究分担者：西村秀一
 6. インフルエンザウイルス表面タンパク質の分子認識の計算機シミュレーションによる研究 P. 39
研究分担者：田中成典
研究協力者：福澤 薫 尾曲克己 中島捷久 吉岡彬生 牛尾律子
 7. HA 抗体複合体の構造解析 P. 43
研究分担者：安武義晃
研究協力者：川口 晶 鈴木忠樹
- ### III 研究成果の刊行に関する一覧表 P. 49

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成23年度総括研究報告書

新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の解析に関する研究

研究代表者 信澤枝里 （国立感染症研究所 室長）

研究要旨 新型インフルエンザウイルス H1N1pdm09 (新型ウイルス)の病原性および抗原性に関し、網羅的解析を行った。

新型ウイルス感染による重症化例はアレルギー疾患に関連する症例が多い。しかし、その病態形成の機序については全く研究が進んでいない。そこで、新型ウイルスの病原性及び重症化要因の解析に関する基礎研究の一環として気管支喘息モデル NC/Nga マウスで、新型ウイルス感染による喘息悪化の病態モデルの作製を試みた。その結果、喘息発作誘発後の病理組織では、新型ウイルス感染群において喘息発作誘発による病態の悪化が認められた。一方、PR8 株 (H1N1)感染では、このような病態悪化は認められなかった。これらの結果は、気管支喘息発作と新型ウイルス感染が相乗的に働き病態を悪化させることを示唆しており、この病態モデルは、気管支喘息に関連する H1N1pdm09 重症化例の感染病態を反映していると考えられた。

新型ウイルスは従来の季節性インフルエンザウイルス H1N1 (季節性ウイルス)とは抗原性が異なり、各ウイルスに対する抗体は交叉反応性を示さない。しかし、新型ウイルスが惹起する抗ヘマグルチニン (HA) 抗体のエピトープ構造の詳細は明らかにされていない。新型ウイルス HA の抗原構造の詳細を明らかにし、新型ウイルス感染およびワクチン接種によりヒトで惹起される抗体の抗原認識機構を解明するため下記の研究を行った。(1) 新型ウイルス A/Narita/01/2009 に対する 14 種類のマウス単クローン抗体のエスケープ変異株約 500 株を分離し解析した。その結果、A/Narita/1/2009 の HA 分子上には少なくとも 3 つの抗原領域が存在することが明らかになった。アミノ酸置換部位の解析から、H1HA 蛋白の既知の抗原領域の Sa、Sb、Ca2 領域に相当し、Sa と Sb 領域が重なり合っている事が判明した。また、同一抗原領域内であっても季節性 H1HA にみられる変異とは異なるアミノ酸置換をもつ変異株が 8 割を占めた。(2) 新型ウイルスワクチン接種者約 100 名を対象とし、ヒト血清中中和抗体が認識する、新型 HA の抗原領域の同定を行った。対象としたワクチン接種後血清のうち約 40%が新型 HA の HA1 領域に特異的に結合したため、さらに血清

抗体が認識結合する抗原領域の特定を試みた。その結果、大半の血清が site Ca に結合した。さらに、これらの血清の、新型 HA に対する単クローナル抗体エスケープ変異株に対する反応性を検討した結果、やはり Ca 領域に変異を有する変異株に対して、反応性が著しく低下していた。(3) 新型ウイルスが惹起するヒトの液性免疫応答ならびに抗 HA 抗体のエピトープ構造を解析するため、ワクチン接種により誘導された末梢血記憶 B 細胞とプラズマ細胞を分離し、HA 特異的な単クローナル抗体を作製する系の構築に成功した。この系を用いた解析の結果、ワクチン接種後一ヶ月以降の記憶 B 細胞に比べ、接種後一週間後の末梢血から分離したプラズマ細胞では、HA 結合性細胞が高頻度 (0.2%以上) で出現することが判明した。さらに、1名のドナーから 8 種類の抗 HA 単クローナル抗体を作製することに成功した。(4) 2009 年～2011 年にかけて、新型ウイルスワクチン接種をした病院職員 419 人の HI 抗体価を調べ、さらに、その後の抗体価の推移を年 2 回のシリーズ血清を用いて調べた。その結果、被接種者の約 3 割が、HI 抗体無応答者であり、さらにその 3 割は、その後同ワクチンの再接種があつたにもかかわらず有効な抗体価を獲得していなかった。さらに、同ウイルスに罹患した患者 86 例から得た血清を調べ、そのうち 1 割弱が自然感染でも HI 抗体無応答者であり、1 例を除きみなが中和抗体でも低い抗体価しか示さなかった。(5) 分子動力学法ならびにフラグメント分子軌道法に基づく高速高精度の計算機シミュレーションを行い、蛋白質内の全アミノ酸の相互作用に関する網羅的・系統的な解析を行い、実験からは判断できない各アミノ酸間の結合の生成・消失情報を得た。その結果、HA とヒト型・トリ型レセプターの複合体構造で、HA の 190, 225, 226 番目のアミノ酸に対し、変異の導入とアラニン・スキャニングの計算機実験によって、アミノ酸残基の重要性を定量化した。新型 HA と糖鎖レセプターとの相互作用解析を FMO 法により行い、ヒト型レセプターとの結合における Lys145 の重要性を解明した。1918 年ヒト抗体と過去の HA サブタイプ (1918, 1930, 1934, 2009 など) の複合体構造を作成し、結合特異性に関する計算値と実験値との整合性を確認した。(6) 新型ウイルス HA とそれに対する単一抗体との複合体結晶構造解析を行い、抗原抗体間の相互作用の詳細情報の取得を目指している。HA-単クローナル抗体複合体結晶化のためのモデル実験として、A/Aichi/2/68 由来の HA および mAb β 121d Fab フラグメントの複合体を用いて結晶化実験を行った結果、結晶は 3 種類の形状で得られ、そのうち一種類に関して、2.8 Å 分解能までの回折データ収集に成功している。

研究分担者

信澤枝里 国立感染症研究所 室長
長谷川秀樹 国立感染症研究所 部長
高橋宜聖 国立感染症研究所 室長
西村秀一 国立病院機構 仙台医療
センター 室長
田中成典 神戸大学 教授
松嶋葉子 山形大学 准教授
安武義晃 独立行政法人 産業技術
総合研究所 研究員

A.研究目的

新型ウイルス感染では、喘息を既往歴として有する者が重症化する傾向が指摘されている。特に小児喘息は喘息重症度にかかわらずインフルエンザ重症化のリスクが高いことが最近の疫学調査により明らかにされた。しかし、喘息患者でのインフルエンザ重症化の病因・病態については全く分かっていない。

一方、新型ウイルスは、主要抗原 HA がクラシカルブタインフルエンザウイルス H1N1 に由来し、従来の季節性ウイルスとは抗原性が異なる。パンデミック発生直後の新型ワクチン接種後の高い陽転率を考慮すると、季節性ウイルス感染あるいはワクチン接種によるプライミング効果の可能性も考えられた。しかし、一方では、ワクチン接種、ウイルス感染によっても HI 価の上昇が観察されない集団の存在が明らかになってきた。ヒトの新型ウイルスに対する免疫応答の詳細は、依然として明らかではない。今後の抗原

変異に対応するためにも、新型ウイルスの抗原構造とそれに対するヒトの免疫応答機構を正しく理解する事は重要である。

本研究では、新型ウイルスに特徴的な病原性解明の一手段として、気管支喘息モデル動物を用いて新型インフルエンザ感染実験を行い、喘息患者で起こるインフルエンザ重症化の病態を解明することを目指した。

一方、新型ウイルスの抗原性解明のため 1. マウス単クローナル抗体エスケープ変異株を用いた新型ウイルス HA の抗原構造の解析、2. 新型ウイルス感染あるいはワクチン接種後のヒト中和抗体（単クローナル抗体およびポリクローナル抗体）が認識する抗原領域の同定、3. 血清疫学的研究による、新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の解明、4. 計算機実験による新型ウイルスの抗原抗体反応、受容体との結合能に関わる HA 上の重要なアミノ酸残基の定量化、および HA-抗体複合体の結晶構造解析による、抗原抗体結合反応における重要なアミノ酸残基の同定を目的とした。

B.研究方法

●病原性の解析

・気管支喘息モデルマウス NC/Nga に卵白アルブミン(OVA)を2回投与し、アレルギーを惹起した後、新型ウイルス A/Narita/1/2009 あるいは、コントロールとして A/PR/8/34(PR8)株を経鼻接種し、さらに喘息発作を誘発するため OVA を経

鼻投与した。

●抗原性の解析

◎抗原構造の解析：

新型ウイルス A/Narita/1/2009HA に対する 14 種類のマウス単クローン抗体を用いて、約 500 株のエスケープ変異株を分離した。各変異株の変異箇所を同定後、各単クローン抗体に対する反応性を血球凝集抑制試験（HI 試験）により検討した。

◎ヒト抗体による新型ウイルス抗原構造認識機構の解析：

・血清中の抗体が結合する HA 上の抗原領域を同定するため、Narita 株 HA、WSN 株 HA、及び Narita 株 HA と WSN 株 HA とのキメラ HA をそれぞれ作製し、哺乳動物細胞上で単独発現させた。この細胞に新型ウイルスワクチン接種者のペア血清を反応させ、血清抗体が認識するウイルス抗原上の領域を同定した。さらに単クローン抗体エスケープ変異株との反応性を HI 試験により検討し、血清抗体が認識する HA 上の領域を特定した。

・新型インフルエンザワクチン接種者から抹消血を採取し、抹消血単核球を分離し、新型 HA 特異的記憶 B 細胞とプラズマ細胞の同定、分離を行った。分離した細胞から抗体遺伝子をクローニングし、抗体タンパクの発現を行った。

◎新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の解析：

新型ウイルスワクチン接種者及び感染者のペア血清を用いて HI 試験および放射免疫沈降法による抗体価の測定を行

った。

●新型 HA タンパクの構造解析：

・分子動力学法ならびにフラグメント分子軌道法に基づく高速高精度の計算機シミュレーションを行い、蛋白質内の全アミノ酸の相互作用に関する網羅的・系統的な解析を行った。

・新型ウイルス HA および HA-抗体複合体の結晶構造解析を行うため、新型ウイルス HA の調整、結晶化条件の検討等を行った。

（倫理面への配慮）

動物を用いた感染実験は、国立感染症研究所の実験動物委員会の承認のもとに実施した。ヒト由来試料を用いた実験は、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

C.研究結果

(1)気管支喘息モデル動物における新型インフルエンザウイルス感染の病態解析

Narita 株感染 OVA 負荷動物においては、明らかな立毛と元気消失を認めたが、Mock 感染 OVA 負荷動物、ウイルス感染 PBS 負荷動物では、明らかな立毛、元気消失は見られなかった。さらに OVA 負荷動物では、Narita 株感染では、Mock 感染に比べ、細気管支周囲や血管周囲に好酸球を含む炎症細胞浸潤の程度が明らかに悪化しており、肺洗浄液中の細胞数も増加していた。一方、mRNA 定量の結果から、Narita 株感染で OVA 負荷の有無で肺組織のサイトカイン発現量には、差が

見られた。

(2) 新型ウイルスHA分子上の抗原構造の解析

中和活性をもつ16種類の単クローン抗体に対するエスケープ変異株を各10株、合計約500株を採取した。それぞれの変異株のHA1領域の塩基配列を決定しアミノ酸置換部位を検討したところ、変異箇所と変異アミノ酸が異なる計40種類のエスケープ変異株を入手することが出来た。

14種類の単クローン抗体と、各抗体との反応性を欠く15種類のエスケープ変異株のすべての組み合わせについてHI試験を行い、各抗体が認識する抗原領域を決定した。その結果、A/Narita/1/2009のHA分子には中和抗体を産生する抗原領域（エピトープ）が3つSa, Sb, Caが存在し、このうちのSaとSbは重なり合っていることが明らかになった。

(3) ヒトの血清抗体が認識する新型ウイルス抗原上の抗原構造の解析

◎ヒト（ポリクローナル）抗体による新型ウイルス抗原認識領域の解析

108人のワクチン接種者のペア血清とキメラHAとの反応性を検討した。その結果、約40人で、ワクチン接種後の血清のみがNarita/WSN(HA1/HA2)に特異的に反応し、新型ウイルス特異的抗原領域を認識すると考えられた。そこで、さらに結合領域を詳細に検討した結果、Ca領域を認識する血清が最も多かった。

さらにHI試験により、エスケープ変

異株との反応性を検討した結果、血清の多くがSa-Sb領域およびCa領域に変異がある変異株に対して反応性を低下させていた。

◎新型ウイルスを認識するヒト単クローン抗体の作製

ワクチン接種前後の末梢血単核球を用いて、新型ウイルスHAに結合する記憶B細胞をフローサイトメトリにより選別した。その結果、ワクチン接種後約1ヶ月では、HAに結合する記憶B細胞の数が、接種前に比べて増加する事が判明した。しかし、その頻度は0.01%以下であった。一方、ワクチン接種後1週間の抹消血単核球を用いてプラズマ細胞の頻度を測定した結果、0.2%の抗体産生細胞を検出する事ができた。記憶B細胞とプラズマ細胞が発現する抗体遺伝子をクローニングし、抗体蛋白質を発現する系の確立を試み、成功した。記憶B細胞及びプラズマ細胞から計10種類のモノクローナル抗体を作製する事に成功した。

(4) 新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の血清疫学的解析

新型インフルエンザワクチン接種者を対象にHI抗体価の上昇率を検討した結果50、60歳代では、幾何平均抗体価、抗体保有率が低い集団が半数に達した。この中にはワクチン接種を数回繰り返し受けても、有効防御免疫の値に達しない集団も存在した。複数種のワクチン接種を受けた症例に関して新型ワクチン接種に対する反応性との比較を行った結果、一

部で、B型ワクチン接種に対する反応性との間で相関が見られた。さらに新型ウイルス感染者の中でもHI抗体価の低い症例が、存在し中和抗体価も測定した結果半数は中和抗体価の上昇が観察されているが、残りの症例では、中和抗体価も検出されなかった。

(5) 新型 HA タンパクの構造解析：

◎HA タンパク質の分子認識の計算機シミュレーションによる研究

1918年スペインカゼウイルスHA (H1N1) に対する mAb とスペインカゼ HA との複合体の情報をもとに、HA のみ新型ウイルス HA、過去の H1HA、他亜型 HA との複合体を作製し、結合特異性に関する計算値と実験値との整合性を確認した。

◎HA-抗体複合体の構造解析

新型ウイルス HA をウイルス粒子から切り出す条件を検討中である。一方結晶化の条件検討を、既に結晶化が行われている A/Aichi/2/68 をモデルとして行い、結晶化に成功した。

D. 考察

(1) 気管支喘息モデル動物における新型インフルエンザウイルス感染の病態解析

ヒトアトピー性皮膚炎のモデルである NC/Nga マウスを用いた OVA 感作気管支喘息モデルで、Narita 株感染と PR8 株感染で、喘息発作増誘発に対する反応性を比較すると、Narita 株で、著明な炎症悪化が観察された。また、Narita 株感染では、OVA 負荷により肺洗浄液中の細胞

数も増加しており、病理組織像を反映していた。Narita 株感染では、喘息発作誘導の有無でサイトカインプロファイルに違いがみられた。しかしながら、このサイトカインプロファイルの相違と病態との関係性については、不明な点が多く、今後、さらに詳細な免疫学的検討が必要と考えられる。

(2) 新型ウイルス HA 分子上の抗原構造の解析

P1 を親株とするエスケープ変異株を用いて行い、中和抗体が認識する抗原領域が3つあることを明らかにした。3つの抗原領域は従来の季節性 H1HA 蛋白で知られている5つの抗原領域の中の Sa、Sb、Ca2 領域に相当した。新型ウイルス HA の抗原構造の特徴として、Sa、Sb 領域が重なり合っている、エスケープ変異株に生じたアミノ酸変異は、同一部位で異なる変異を持つ場合がある、季節性ウイルスの HA と変異部位が一致してもアミノ酸の種類は異なる株が全体の80%を占める等が、観察された。

(3) ヒトの血清抗体が認識する新型ウイルス抗原上の抗原構造の解析

新型ウイルスワクチン接種者のペア血清とキメラ HA との結合反応の結果、新型 HA の抗原領域 Ca を認識する抗体が産生される集団が全体の約半分存在し、この領域が、抗体による最初の認識領域である事が示唆された。一方、エスケープ変異株との反応性の検討から、多くの血清抗体が、認識する特定のアミノ酸残

基が HA 抗原領域に存在することが示唆された。

近年、単一のヒト B 細胞から、抗体 V_H/V_L 遺伝子をクローニングし、モノクローナル抗体タンパクを作製する技術が開発されている。本研究では、この方法を H1N1 インフルエンザワクチン接種者に適用し、H1N1 インフルエンザウイルス HA に結合するモノクローナル抗体の迅速な作製システムを構築する事に成功した。今後、この手法を用いて、ワクチン接種歴、インフルエンザ感染履歴の異なる様々なグループのドナーからモノクローナル抗体を作製し、その認識領域の解析に役立てていく。

(4) 新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の血清疫学的解析

50-60 歳代のワクチン接種者で HI 抗体価が上昇しない集団の存在し、この集団の中には複数回ワクチン接種を受け続けても HI 抗体価が上がらない集団することが判明した。この集団の免疫応答をさらに理解するため、中和抗体、NA 活性阻害抗体等の測定を行う必要がある。新型ワクチンとそれ以外のワクチンの接種で、免疫応答を比較すると、両者に反応性が低い集団が存在していた。また、*新型ウイルス*感染によっても抗体価の上がりにくい集団の存在が明らかとなり、今後、中和抗体産生の確認、それ以外の免疫応答の可能性を検討する必要がある。

(5) 新型 HA タンパクの構造解析：

◎HA タンパク質の分子認識の計算機シ

ミュレーションによる研究

今後、ヒト抗体に対する新型 HA の結晶構造が解析されたのち、その構造上で抗体との結合に強く関わるアミノ酸残基を特定する。

◎HA-抗体複合体の構造解析

新型ウイルス HA は、ウイルス粒子からブロメライン等のプロテアーゼで切り離すのが非常に困難で、結晶化のための HA タンパクの収集法を改善する必要がある。HA のみをバキュロウイルスベクターにクローニングし、HA を大量に産生させる系もあるが、最終的に産生される HA タンパクがウイルス粒子上に発現する HA と全く同等であると言う保証はなく、従来の古典的な手法を用いている。現在、ブロメラインによる切断を可能にする手法を構築中である。

E. 結論

◎アレルギー素因を有する NC/Nga マウスを用いて新型インフルエンザウイルス感染による喘息発作悪化の病態モデルを構築し、病理学的、免疫学的に解析した。

◎*新型ウイルス* HA の抗原構造地図をほぼ完成させた。新型 HA の抗原構造には、従来の季節性ウイルス HA とは異なる特徴的な抗原構造が存在する事を明らかにした。

◎*新型ウイルス*ワクチン接種者の血清抗体のうち、*新型ウイルス* HA に特異的に反応する抗体の半数は Ca 領域を認識する事が明らかになった。

●H1N1 インフルエンザウイルスに結合するヒト記憶B細胞とプラズマ細胞を分離し、その抗体遺伝子からモノクローナル抗体を作製することに成功した。

●新型ウイルスワクチン接種および感染に対する抗体反応の無～低応答者が、健常人の広範な年齢層で確認された。今後、この集団の免疫応答のしくみを明らかにしていく必要がある。

●分子動力学 (MD) 法とフラグメント分子軌道 (FMO) 法を用いた高精度計算機シミュレーションを行うことで、HAタンパク質に関わる分子間相互作用の定量的な解析が可能となった。

●新型 HA の膜外ドメインの調整を可能とする条件を新たに検討する必要がある。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

論文発表

1. 論文発表

1. Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. ACS Chem Biol. 2012 Jan 13.

2. Aina A, Tamura S, Suzuki T, Ito R,

Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. J Med Virol. 2012 Feb;84(2):336-44.

3. Suzuki T, Aina A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H. A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Nov 4;414(4):719-26. Epub 2011 Oct 6.

4. Furukawa T, Muraki Y, Noda T, Takashita E, Sho R, Sugawara K, Matsuzaki Y, Shimotai Y, Hongo S: Role of the CM2 protein in the influenza C virus replication cycle. J Virol 85(3):1322-1329, 2011.

5. E. Nobusawa, K. Omagari, S. Nakajima, K. Nakajima Reactivity of human convalescent sera with influenza virus HA protein mutants at antigenic site A. Microbiology and Immunology. In press (2012)

6. Yoshioka Akio, K. Takematsu, I. Kurisaki, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki,

- T. Nakano, E. Nobusawa, K. Nakajima, and S. Tanaka, "Antigen-Antibody Interactions of Influenza Virus Hemagglutinin Revealed by the Fragment Molecular Orbital Calculation", *Theor. Chem. Acc.* 130 (2011) pp. 1197-1202.
7. Yoshioka Akio, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, E. Nobusawa, K. Nakajima, and S. Tanaka, "Prediction of Probable Mutations in Influenza Virus Hemagglutinin Protein Based on Large-Scale Ab Initio Fragment Molecular Orbital Calculations", *J. Mol. Graph. Model.* 30 (2011) pp. 110-119.
8. Kaori Fukuzawa, Katusmi Omagari, Katsuhisa Nakajima, Eri Nobusawa, Shigenori Tanaka. Sialic acid recognition of the pandemic influenza 2009 H1N1 virus: binding mechanism between human receptor and influenza hemagglutinin. *Protein and Peptide letters.* 18, 530-539, 2011
9. Harada, Y., Ninomiya-Mori, A., Takahashi, Y., Shirakura, M., Kishida, N., Kageyama, T., Tada, Y., Tashiro, M., Odagiri, T. Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. *Vaccine*, Sep 10. [Epub ahead of print] 2011
10. Fujii, H., Ato, M., Takahashi, Y., Otake, K., Hashimoto, S., Kaji, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Fujita, M., Adachi, A., Nayakaya, T., Taniguchi, M., Koyasu, S., Takemori, T. HIV-1 Nef impairs multiple T-cell functions in antigen-specific immune response in mice. *Int. Immunol.*, 23, 433-441, 2011
11. 高橋宜聖、小野寺大志、小林和夫 「ウイルス感染局所における記憶 B 細胞応答」 実験医学増刊、29、81-86、2011
- 2.学会発表
1. 長谷川秀樹、成人 T 細胞性白血病 (ATL)モデルマウスを用いた新規治療法の試み 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月横浜
2. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、熊坂利夫、羽田悟、田中伸哉、笠井孝彦、鄭子文、飯塚利彦、仲里巖、樋野陽子、濱松晶彦、堀尚、田中智之、長谷川章雄、尾矢剛志、佐多徹太郎 2009H1N1 パンデミックインフルエンザウイルス感染症

- 20 剖検例の臨床病理学的解析 第
100 回日本病理学会総会 2011 年 4
月横浜
3. Akira Ainai, Ryo Ito, Hideki Asanuma,
Tadaki Suzuki, Takeshi Tanimoto,
Takato Odagiri, Shin-Ichi Tamura,
Tetsutaro Sata, Masato Tashiro, Hideki
Hasegawa INTRANASAL
ADMINISTRATION OF 2009/10
ANNUAL INFLUENZA VACCINE
INDUCE THE
CROSS-PROTECTION AGAINST
2009 PANDEMIC INFLUENZA
VIRUS INFECTION, XV
International Congress of Virology,
Sep 2011 Sapporo
 4. Elly van Riet, Akira Ainai, Ryo Ito,
Tadaki Suzuki, Shin-Ichi Tamura,
Masato Tashiro, Hideki Hasegawa,
INFLUENZA SPECIFIC IGA
PRODUCING SERUM MEMORY B
CELLS CORRELATE TO
PROTECTIVE ANTIBODIES IN
THE SERUM AS WELL AS LOCAL
IGA RESPONSES, XV International
Congress of Virology, Sep 2011
Sapporo
 5. Ryo Ito, Akira Ainai, Hideki Asanuma,
Tadaki Suzuki, Joe Chiba, Shin-Ichi
Tamura, Masato Tashiro, Tetsutaro
Sata, Hideki Hasegawa ANALYSIS
OF THE IMMUNE RESPONSES
AFTER INTRANASAL BOOSTER
INFLUENZA VACCINE WITH
HETEROLOGOUS VIRUS
PRIMING XV International Congress
of Virology, Sep 2011 Sapporo
 6. Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Elly
van Riet, Tadaki Suzuki, Ryo Ito,
Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri,
Masato Tashiro, Tetsutaro Sata,
Takeshi Kurata, Shin-Ichi Tamura,
INTRANASAL ADMINISTRATION
OF AN INACTIVATED
WHOLE-VIRION INFLUENZA
VACCINE EFFECTIVELY INDUCES
THE NEUTRALIZING
ANTIBODIES BOTH IN THE
SERUM AND THE NASAL WASH
IN HUMAN XV International
Congress of Virology, Sep 2011
Sapporo
 7. Hideki Asanuma, Mina Nakauchi,
Kayoko Sato, Eri Nobusawa, Akira
Ainai, Norio Yamamoto, Nami
Konomi, Hideki Hasegawa, Masato
Tashiro COMPARISON OF
INFLUENZA A/H1N1 PDM09
VACCINE PRODUCTIONS IN
EGGS VERSUS CELL CULTURES
AND THE PROTECTIVE IMMUNE
RESPONSES INDUCE IN MICE XV

- International Congress of Virology,
Sep 2011 Sapporo
8. Tadaki Suzuki, Akira Ainai, Noriyo Nagata, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa
ROLE OF THE N-TERMINAL REGION OF THE PA SUBUNIT IN NUCLEAR IMPORT AND ASSEMBLY OF INFLUENZA A VIRUS RNA POLYMERASE XV
International Congress of Virology,
Sep 2011 Sapporo
 9. Tatsuya Yamazaki, Yasutomo Teshima, Daisuke Ninomiya, Maria Nagashima, Yuka Arai, Akira Fujimoto, Akira Ainai, Hideki Hasegawa, Joe Chiba
PASSIVE IMMUNOTHERAPY AGAINST INFLUENZA VIRUS INFECTION USING THE EXPRESSION OF NEUTRALIZING ANTI-HEMAGGLUTININ MONOCLONAL ANTIBODIES FROM PLASMIDS BY HYDRODYNAMICS-BASED PROCEDURE XV
International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
 10. 長谷川秀樹 感染防御に効くインフルエンザワクチンを目指して
第 15 回日本ワクチン学会学術集会
2011 年 12 月東京
 11. 相内章、浅沼秀樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、田代真人、長谷川秀樹
2009/10 季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与による A/H1N1pdm09 ウイルスの感染防御
第 15 回日本ワクチン学会学術集会
2011 年 12 月東京
 12. Yoko Matsuzaki, Kanetsu Sugawara, Yoshitaka Simotai, Seiji Hongo, Eri Nobusawa: Antigenic structure of the hemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1) virus. Meetings of the three divisions of the international union of microbiological societies 2011, Sapporo; September 2011.
 13. 松崎葉子, 池田辰也, 青木洋子, 菅原勘悦, 下平義隆, 本郷誠治, 安孫子千恵子, 水田克巳: リアルタイム PCR 法を用いた C 型インフルエンザウイルス検出の試み. 第 65 回日本細菌学会東北支部総会, 山形; 2011 年 8 月
 14. 下平義隆, 村木 靖, 菅原勘悦, 松崎葉子, 本郷誠治: C 型インフルエンザウイルス CM2 タンパク質の細胞質領域の解析. 第 65 回日本細菌学会東北支部総会, 山形; 2011 年 8 月
 15. Mina Nakauchi, Emi Takashita, Masato Tashiro, Hidekazu Nishimura, Eri Nobusawa: Analysis of antigenic sites on the HA protein of pandemic influenza H1N1pdm09 virus,

- recognized by human antibody. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011
16. Yoko Matsuzaki, Kanetsu Sugawara, Yoshitaka Simotai, Seiji Hongo, Eri Nobusawa Antigenic structure or the hemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) virus. XV International Congress of Virology Sep 11-16. 2011
17. Yuichi Harada, Hiroshi Takahashi, Masayuki Shirakura, Eri Nobusawa, Norio Yamamoto, Kazuya Nakamura, Itsuki Hamamoto, Hideki Asanuma, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura Growth Ability of reverse genetically generated influenza A/H1N1 pdm09 viruses in MDCK and LLC-MK2 cell lines. XV International Congress of Virology Sep 11-16. 2011.
18. Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kakyoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Ainai, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro: Comparison of influenza A/H1N1pdm09 vaccine productions in eggs versus cell cultures and the protective immune responses induce in mice. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011
19. (第41回日本免疫学会、千葉、2011年11月)
Takahashi, Y. 「Protective memory B cell responses to influenza virus infection」 第41回日本免疫学会、千葉、2011年11月 (シンポジウム、招待講演)
20. Onodera, T., Aizawa, R., Hosono, A., Kaminogawa, S., Kobayashi, K., Takahashi, Y. 「Role of Toll-like receptor signaling for the development and reactivation of virus-specific memory B cells」 第41回日本免疫学会、千葉、2011年11月
21. Yokoi, Y., Onodera, T., Hachimura, S., Ato, M., Kobayashi, K., Takahashi, Y. 「Localization and reactivation of virus-specific memory B cells at the site of virus infection」 第41回日本免疫学会、千葉、2011年11月
22. Akio Yoshioka and Shigenori Tanaka: Comparison of Antigen- Antibody Binding by the Fragment Molecular Orbital Calculations for Swine-Origin Influenza Hemagglutinin Proteins 日本生物物理学会第 49 回年会、2011 年 9 月 18 日、兵庫県立大学・姫路書写キャンパス

23. 田中成典：
「蛋白質の電子状態計算と医療・創薬・環境科学への応用」
(第4回バイオナノシステムズ研究会、2011年8月5日、臨床情報研究センター、神戸)
24. 田中成典：
「フラグメント分子軌道法を用いた薬剤耐性メカニズムの解析」
(平成23年度地球シミュレータ利用報告会、2012年2月7日、横浜)

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

長谷川秀樹：特許第4817625号 粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン
登録日平成23年9月9日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の解析に関する研究

病原性及び重症化要因の解析

—気管支喘息モデル動物における新型インフルエンザウイルス感染の病態解析—

研究分担者:長谷川秀樹(国立感染症研究所 感染病理部 部長)

研究協力者:川口 晶(国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター第四室 任期付研究員)

鈴木忠樹(国立感染症研究所 感染病理部第二室 研究員)

佐藤由子(国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官)

研究要旨: 新型インフルエンザ H1N1pdm09 重症化例の感染病態ではアレルギー疾患に関連する例が多いが、その病態形成の機序については全く研究が進んでいない。そこで、本研究では H1N1pdm09 のウイルスの病原性及び重症化要因の解析に関する基礎研究の一環として、アレルギー素因を有する近交系マウスを用いて新型インフルエンザウイルス感染により喘息発作が悪化するという病態モデルの作製を試みた。OVA-Alum 腹腔内接種により感作した NC/Nga マウス(気管支喘息モデル)に H1N1pdm09 ウイルスを感染させ、感染後に OVA を気道内に負荷し喘息発作を誘発し、その病態を病理組織学的、免疫学的に検討した。喘息発作誘発後の病理組織では、Narita 株 (H1N1pdm)感染群において喘息発作誘発による病態の悪化が認められた。一方、PR8 株 (H1N1)感染では、このような病態悪化は認められなかった。これらの結果は、気管支喘息発作と H1N1pdm09 感染が相乗的に働き病態を悪化させることを示唆しており、この病態モデルは、気管支喘息に関連する H1N1pdm09 重症化例の感染病態を反映していると考えられた。

A. 研究目的

2009 年より流行が始まった新型インフルエンザ (H1N1pdm09)では、喘息を既往歴として有する者が重症化する傾向があることが指摘されている。特に小児喘息は喘息重症度にかかわらずインフルエンザ重症化のリスクが高いことが最近の疫学調査により明らかになってきた。しかしながら、喘息患者でのインフルエンザ重症化の病因・病態については全く分かっていない。本研究は気管支喘息モデル動物を用いて新型インフルエンザ感染実験を行い、

喘息患者で起こるインフルエンザ重症化の病態を解明することを目指した。

一般的に喘息と呼吸器ウイルス感染症の関係性については、(1)気管支喘息の発症因子としての呼吸器ウイルス感染症、(2)喘息発作誘発因子としての呼吸器ウイルス感染症、(3)呼吸器ウイルス感染症により惹起される病態の悪化と喘息、という主に三つの観点から研究が進んでいる。昨年度までに行ったヒトアトピー性皮膚炎のモデルである NC/Nga マウスを用いた H1N1pdm09 株感染実験に

よると、感染のみでは NC/Nga マウスにおいて気管支喘息は惹起されなかった。しかしながら、H1N1 亜型の PR8 株に比べ H1N1pdm09 の Narita 株では炎症反応が強い傾向が認められ、従来のインフルエンザウイルスによる病態とは異なる現象が起こっている事が示唆された。

そこで本年度は、喘息発作誘発因子としての呼吸器ウイルス感染症という観点から、アレルギー素因を有する NC/Nga マウスにおいて Narita 株感染が喘息発作増悪因子として作用するかどうかを検討した。

B. 研究方法

1) 気管支喘息モデルの構築と感染実験

6 週齢の NC/Nga マウスに卵白アルブミン (OVA) 100 μ g + alum 2mg / 200 μ l PBS を1週間間隔で2回腹腔内投与した。

最終投与から1週間後にマウス馴化株である Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/34(H1N1))、新型インフルエンザウイルスである Influenza A virus (A/Narita/1/2009(H1N1pdm09))を一匹あたり 1 x 10³ PFU/20 μ l (PR8 株)もしくは 4 x 10⁴ PFU/20 μ l (Narita株)でケタラール/キシラジン麻酔下で経鼻接種した。接種ウイルス量は、いずれの株も 40 LD₅₀に相当する。Narita株はBALB/cマウスの肺内にて 15 代継代しマウスに馴化させた株を用いた。対照群には、ウイルスを接種していない有精卵 (10 日卵)の漿尿液を接種ウイルス液と同程度に希釈したものを用いた。

次に気管支喘息発作を誘発するためにウイルス接種 1 日後と 2 日後に OVA 100 μ g / 20 μ l PBS を経鼻投与した。対照群には PBS のみを投与した。最後の OVA 経鼻投与から 24 時間後にこれらの動物

を過麻酔殺し、肺洗浄液(BALF)の採取と心臓採血を行った。その後、肺を採取し、採取した組織材料は一部を-80°Cに保管し、残りを 10% ホルマリン緩衝液に浸漬固定した。この動物実験は国立感染症研究所の実験動物委員会の承認のもとに実施した。

2) BALF 細胞数計測

BALF 中の総細胞数を Vetscan を用いて計測した。各細胞種は BALF を CytoSpin 4 Cytocentrifuge (Thermo)を用いてガラス上に密着させギムザ染色およびヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施し、正立顕微鏡 BX43(オリンパス)を用いて計測した。

3) RNA 抽出

-80°Cに凍結保存して肺組織を常法によりホモジネートして、Trizol (Invitrogen)を用いてメーカー推奨のプロトコルに従い RNA を抽出した。抽出した RNA は-80°Cに保管した。

4) 定量 PCR

DNase (Invitrogen)を用いて DNase 処理した肺 RNA 2 μ g を Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)を用いて RT 反応を行い cDNA として定量 PCR に用いた。各種サイトカイン (IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-12)の肺における発現量を Taqman probe (表1)を用いた定量 PCRにより測定した。それぞれの値は b-actin の発現量により補正を行った。酵素は Quantitect Probe PCR kit (Qiagen)を用いてプロトコルに従って行った。

5) 病理学および免疫組織学的検索

10%ホルマリン緩衝液固定のインフルエンザウ

ウイルス感染マウス肺組織材料は、常法どおりパラフィン包埋切片を作製した。脱パラフィン後、一部はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施した。また、ウイルス抗原を検出するために、一次抗体として抗インフルエンザウイルス NPタンパクポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を実施した。脱パラフィンした切片を抗原賦活化剤(pH9.0)(ニチレイ)中で121°C20分オートクレーブ処理によって抗原賦活化した。その後、過酸化水素水・メタノールによる内因性ペルオキシダーゼの阻止を室温30分で処理し、1次抗体(4000倍希釈)を加え4°Cで一晩インキュベートした。その後、ENVISION+ (DAKO)を用いてプロトコル通り免疫染色を実施した。

C. 研究結果

1) 病理学的解析

Mock感染 OVA 負荷動物、ウイルス感染 PBS 負荷動物はいずれも接種 3 日目に、明らかな立毛、元気消失は見られなかったのに対し、Narita 株感染 OVA 負荷動物においては、明らかな立毛と元気消失を認めた。解剖時、これらの Narita 株感染個体においては肺の一部に赤褐色調を呈する病変が肉眼的に観察できた。組織学的には、PBS 負荷動物において、PR8 株感染、Narita 株感染いずれの群においても細気管支や肺胞領域にマクロファージや好中球、リンパ球等の炎症細胞浸潤を認めた。一方で OVA 負荷動物においては、Mock 感染群においても細気管支周囲や血管周囲に好酸球を含む炎症細胞浸潤を認め、Narita 株感染では、それらの炎症の程度が明らかに悪化していた。しかしながら PR8 株感染では、PBS 負荷動物に比べ炎症の程度が弱いか同程度であった。(図1)

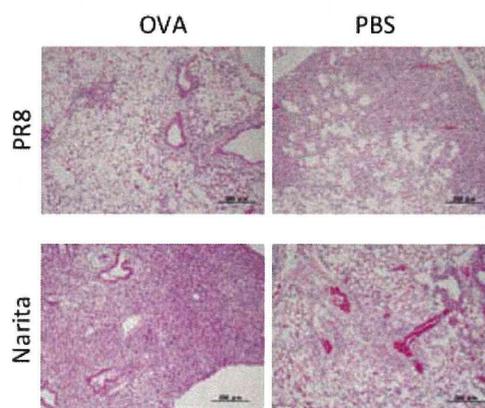


図1 肺組織の病理組織

2) 肺洗浄液(BALF)の解析

感染 3 日目に採取した BALF 中に存在する細胞数を計測した所、Mock 感染群では OVA 負荷によって BALF 中の細胞数が増加していた。PR8 株感染群では、OVA 負荷と PBS 負荷では明らかな細胞数の変化は認められなかった。一方、Narita 株感染群においては、OVA 負荷によって著明に BALF 中の細胞数が増加しており、PBS 負荷群の2倍、Mock 感染 OVA 負荷群の3倍の細胞を認めた。(図2)

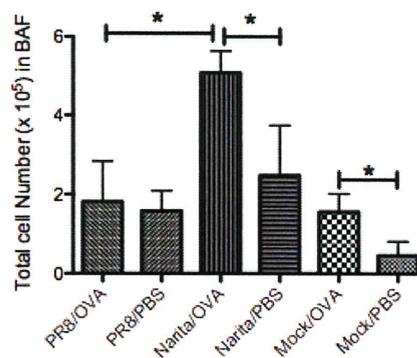


図2 BALF 中の細胞数

次に BALF 中のウイルス量をブラックアッセイにより定量した所、PR8 株感染、Narita 株感染のいずれの群においても OVA 負荷群と PBS 負荷群で明らかな差は認められなかった。(図3)

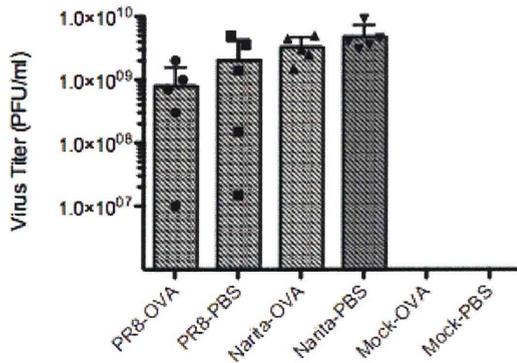


図3 BALF 中のウイルスタイトル

3) 肺組織中サイトカインの解析

感染3日目に採取した肺組織の一部から RNA を抽出し、各種サイトカイン (IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-12) の肺における発現量を定量した。その結果、Mock 感染、PR8 株感染、Narita 株感染のいずれの群においても OVA 負荷により IL-4 の発現上昇が見られた。しかしながら、その上昇の程度はウイルス感染群では Mock 感染群に比べ低レベルであった。また、IFN- γ と炎症性サイトカイン (IL-6, IL12) は Mock 感染、PR8 株感染では OVA 負荷によりほとんど変化が見られなかったのに対し、Narita 株感染においては OVA 負荷により、いずれのサイトカインも著明に低下していることが明らかになった。(図4)

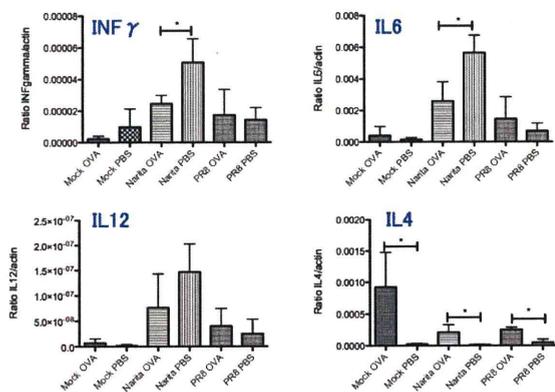


図4 肺組織中のサイトカイン発現量

D. 考察

ヒトアトピー性皮膚炎のモデルであるNC/Nga マウスを用いたOVA感作気管支喘息モデルではBALB/cマウスに比べ血中IgEの上昇、肺組織への好酸球浸潤、気管上皮での粘液産生の亢進といった気管支喘息に特有の症状を強く引き起こすことが知られることから、気管支喘息の良い疾患モデルとされている。本研究ではこの気管支喘息モデルを用いてH1N1pdm09 感染が喘息発作を悪化させるかどうか、検討を行った。対照群としては、インフルエンザウイルス感染のマウスモデルとして良く用いられているPR8株を用いた。それぞれの株でマウスに対する感受性が異なるが、今回の実験では、病態に与える影響を検討することが目的であり、LD₅₀を基準に投与ウイルス量を決定した。この条件においては、Narita株感染とPR8株感染でOVA負荷による喘息発作誘発に対する反応性の違いが見られた。病理組織学的検査では、Narita株感染ではOVA負荷により著明に炎症が悪化するが、PR8株感染ではOVA負荷によりむしろ炎症が減弱する傾向を明らかになった。BALF中の細胞数は病理組織像を反映した結果が得られており、Narita株感染はPR8株感染とは異なり、喘息発作を増悪させていると考えられた。肺組織のサイトカインmRNA定量の結果から、Narita株感染では、喘息発作の誘導の有無でサイトカインプロファイルに違いが見られた。しかしながら、このサイトカインプロファイルの相違と病態との関係性については、不明な点が多い。また、このようなサイトカイン産生の相違がどのような機序により起こってくるかも未だ明らかではなく、さらに詳細な免疫学的検討が必要と考えられる。

今後は、このNC/Ngaマウスを用いた喘息発作増悪モデルを病理組織学的に詳細に解析するとともに

病態形成に関わるサイトカインを網羅的に解析し、病態形成に関わる宿主要因を探索する。また、他のインフルエンザウイルス株を用いた実験を行い、このような喘息発作悪化という病態は H1N1pdm09 株に特異的な現象であるかを検討する。

E. 結論

アレルギー素因を有する NC/Nga マウスを用いて新型インフルエンザウイルス感染による喘息発作悪化の病態モデルを構築し、病理学的、免疫学的に解析した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. *ACS Chem Biol*. 2012 Jan 13.

2. Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol*. 2012 Feb;84(2):336-44.

3. Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K, Takashiba S,

Ainai A, Ohnishi M, Watanabe H, Senpuku H. Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* elicit a mucosal immune response. *PLoS One*. 2011;6(10):e26163. Epub 2011 Oct 14.

4. Suzuki T, Ainai A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H. A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Nov 4;414(4):719-26. Epub 2011 Oct 6.

5. Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H. Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. *Front Microbiol*. 2011;2:175. Epub 2011 Aug 25.

6. Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol*. 2012 Jan;25(1):1-13. Epub 2011 Aug 26.

7. Meguro S, Tomita M, Katsuki T, Kato K, Oh H, Ainai A, Ito R, Takeda S, Kawai T, Atsumi Y, Itoh H, Hasegawa H. Plasma 25-hydroxyvitamin D is independently associated with hemoglobin concentration in male subjects with type 2 diabetes mellitus. *Int J Endocrinol*. 2011;2011:362981. Epub 2011 Jun 6.

2. 学会発表